

KARAKTERISASI PROTEASE *Bacillus* sp. UGM5

Characterization of protease from *Bacillus* sp. UGM5

T.P. Widowati¹⁾, Soemitro Djojowidagdo²⁾,
Setiyono³⁾, dan Widya Asmara³⁾

ABSTRACT

The objective of this experiment is to identify the characters of protease produced by *Bacillus* sp. UGM5. The protease secreted by *Bacillus* sp. UGM5 was first isolated, purified and then characterized. The crude enzyme has the specific activity of 1.14 U/mg, however, the specific activity of purified enzyme was increased by 23.8 times fold and the recovery was 33.69%. The PAGE of nondenatured crude enzymes shows two types of proteases, however, the SDS-PAGE of denatured purified enzyme showed four protein-bands with molecular weights of 55.5 kDa, 51 kDa, 18 kDa, and 15.5 kDa respectively. The optimum pH and temperature for the enzyme activity are 8.5 and 42°C and belongs to serine protease type, with K_m value 3×10^{-3} mM and V_{max} 0.0890 mM/30 minutes. The activity is not inhibited by Ca^{+2} , Fe^{+2} and EDTA.

INTISARI

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi protease yang diproduksi *Bacillus* sp. UGM5. Protease yang disekresi oleh *Bacillus* sp. UGM5 pertama-tama diisolasi, dipurifikasi kemudian dikarakterisasi. Enzim kasar mempunyai spesifik 1,14 U/mg. Aktivitas spesifik enzim yang dimurnikan meningkat 23,8 kali dengan recovery 33,69%. Elektroforesis gel poliakrilamid enzim kasar tanpa denaturisasi menunjukkan ada dua tipe protease, sedangkan hasil elektroforesis gel poliakrilamid enzim yang dipurifikasi dan didenaturisasi menunjukkan ada empat pita protein dengan berat protein masing-masing 55,5 kDa, 51 kDa, 18 kDa, dan 15,5 kDa. pH dan temperatur optimum aktivitas enzim adalah 8,5 dan 42°C, termasuk tipe protease serin, dengan nilai K_m 3×10^{-3} mM dan V_{max} 0,0890 mM/30 menit. Aktivitas enzim tidak dihambat oleh adanya ion Ca^{+2} , Fe^{+2} dan EDTA.

PENGANTAR

Protease merupakan enzim yang banyak diaplikasikan secara komersial baik didalam industri pangan maupun non pangan. Industri pangan memanfaatkan protease antara lain dalam pembuatan roti, bir, keju, dan pengempukan daging, sedangkan pada industri non pangan protease digunakan antara lain dalam industri deterjen dan penyamakan kulit. Hampir 60% dari jumlah enzim yang diperdagangkan adalah berupa enzim protease (Ward, 1985).

1) BBKKP, Yogyakarta

2) Fakultas Peternakan UGM, Yogyakarta

3) Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisa ikatan peptida pada protein. Protease dapat dihasilkan dari hewan maupun tumbuhan, namun adanya perkembangan teknologi yang pesat terutama dibidang bioteknologi telah menjadikan mikroba sebagai salah satu penghasil protease yang potensial. Mikroba disukai untuk keperluan produksi enzim secara komersial dengan alasan dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktivitasnya lebih mudah ditingkatkan, hasilnya lebih seragam dan harganya relatif lebih murah (Jenny dan Lily, 1994, Suharton dkk, 1994). Salah satu mikroba penghasil protease adalah *Bacillus* sp. (Ward, 1985). Bakteri tersebut mudah tumbuh dalam berbagai media dengan suhu pertumbuhan optimum adalah 37°C dan waktu inkubasi antara 18 - 24 jam (Raju dkk, 1996) atau 24 jam (Takami dkk, 1992), pada kondisi tersebut didapat aktivitas proteolitik tertinggi. Ward (1985) dan Raju dkk (1996) menyatakan bahwa *Bacillus* sp. menghasilkan protease ekstraseluler. Enzim ekstra dan intra yang diproduksi oleh mikroba tersebut termasuk golongan endopeptidase dan mempunyai aktivitas katalitik pada daerah netral sampai alkali (Winarno, 1983). Setiyono dkk (1999) berhasil mengisolasi *Bacillus* sp. UGM5, bakteri ini dikatakan sebagai penghasil protease yang potensial.

Guna mengetahui lebih lanjut tentang sifat-sifat protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut, maka penelitian ini dilakukan. Didalam penelitian ini dilakukan pemurnian protease menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel.

CARA PENELITIAN

Kondisi pertumbuhan mikroba. *Bacillus* sp. UGM5 ditumbuhkan dalam media Luria, diinkubasikan pada suhu 37°C, 24 jam dalam inkubator yang bergoyang. Kultur sebanyak 1 liter dipanen dengan disentrifugasi 11.500 g selama 20 menit, suhu 4°C. Supernatan (925 ml) digunakan sebagai ekstrak kasar protease.

Pengujian aktivitas protease. Aktivitas protease diuji pada substrat kasein (Hammerstein, menurut menurut metoda Malathi dan Chakraborty (1991) dengan buffer tris-Cl pH 8,5 dan sentrifugasi (Kwan dkk, 1983). Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit (U) yang didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 mg tirosin pada kondisi percobaan diatas. Aktivitas spesifik adalah aktivitas enzim per mg protein.

Penentuan protein. Konsentrasi protein ditentukan menurut metode Lowry (Lowry dkk dengan albumin serum sapi digunakan sebagai standar (Peterson, 1997)).

Pemurnian protease. Pekerjaan pemurnian ini dilakukan pada suhu 4°C. Enzim kasar difraksinasi dengan amonium sulfat 40%-70%, didialisis dan dikering-bekukan, kemudian dimasukkan kolom (18cm X 37mm) yang berisi CM-Sephadex C-50. Elusi menggunakan buffer asetat 20 mM pH 6,0 dengan gradient NaCl 0,5M (Yum dkk, 1994). Eluen ditampung, ditentukan profil kandungan proteinnya pada panjang gelombang 275nm. Fraksi dengan aktivitas proteolitik terbesar dikumpulkan dan digunakan sebagai fraksi enzim untuk dikarakterisasi.

Penentuan pola da berat molekul protein enzim. Pola protein enzim ditentukan dengan SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Preparasi sampel memakai metoda Tsuchiya dkk (1992). Berat molekul protein ditentukan melalui nilai pergerakan relatif (RF) pita protein mengacu metoda Weber dan Osborn. (1969).

Overlay gel. Enzim kasar dipisahkan menggunakan elektroforesis poliakrilamid tanpa denaturasi, gel yang dapat diletakkan diatas media agar susu krim selama semalam. Zone bening yang terbentuk menandakan adanya aktivitas proteolitik enzim.

Pengaruh pH dan temperatur terhadap aktivitas protease. Untuk penentuan pH optimum, aktivitas protease diuji pada kisaran pH 5--12. Penentuan suhu optimum dikerjakan pada kisaran suhu 37°C hingga 65°C pada pH optimumnya.

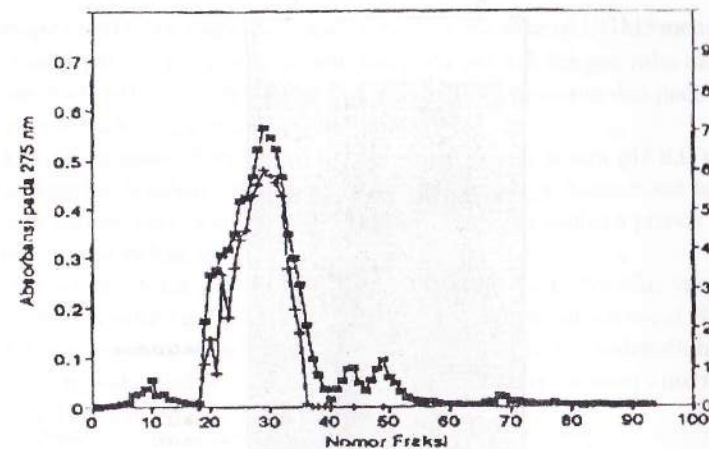
Pengaruh penambahan ion logam dan zat penghambat. Ion logam, atau zat penghambat ditambahkan kedalam enzim, diinkubasikan 15 menit kemudian ditambahkan substrat dalam buffer tris-Cl 100 mM (pH 8,5).

Penentuan nilai Km dan Vmaks. Nilai Km dan Vmaks enzim didekati dengan jalan menentukan aktivitas proteolitiiknya pada berbagai konsentrasi substrat (0,5%-4,0%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian protease. Supernatan kultur setelah dimurnikan menggunakan kolom CM-Sephadex C-50 menunjukkan empat puncak protein yang terdiri dari satu puncak besar dan tiga puncak kecil. Fraksi dengan puncak besar menunjukkan aktivitas proteolitik paling tinggi (Gambar 1). Pemurnian menggunakan amonium sulfat dan CM Sephadex C-50 menghasilkan peningkatan kemurnian enzim 23,8 kali dan hasil akhir 33,69% total aktivitas semula (Tabel 1)

Hasil elektroforosi SDS-PAGE menunjukkan masih ada empat pita protein pada fraksi enzim yang dimurnikan (Gambar 2), dengan demikian pemurnian yang dilakukan masih merupakan pemurnian parsial.



Gambar 1. Profil kandungan protein dan aktivitas proteolitik hasil fraksinasi kolom.

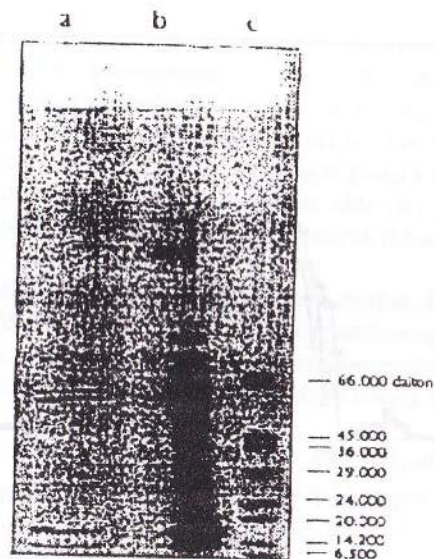
--+-- Aktivitas proteolitik (U/ml)
----- Absorbansi pada 275 nm

Penentuan berat molekul. Protein hasil pemurnian terdiri dari empat p yang masing-masing berat molekul 53,5 kDa, 51 kDa, 18 kDa dan 15,5 kDa. Be molekul dari protein enzim belum dapat ditentukan dengan pasti, meskipun demiki salah satu pita protein tersebut mirip dengan protease-serin A dan B dari *Streptomyces griseus* yang mempunyai berat molekul 18,09 kDa dan 18,63 kDa (Yum dkk 1994).

Hasil elektroforesis ekstra kasar enzim tanda denaturasi yang diinkubasikan pada substrat agar susu skim (*overlay gel*) menunjukkan ada dua macam protease ekstraseluler yang dikandung *Bacillus sp.* UGM5 (Gambar 3).

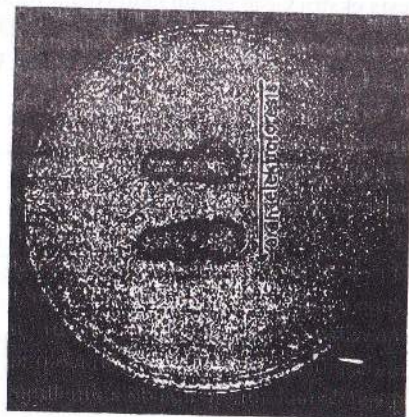
Tabel 1 Hasil pemurnian protease *Bacillus sp.* UGM5

Tahap pemurnian	Total Aktivitas (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Fold (kali)	Hasil (%)
Ekstrak kasar	2941,98	2527,78	1,14	1	100
Fraksinasi Amm.Sulfat	1664,91	260,66	6,39	5,60	66,26
Fraksinasi kolom	864,48	30,04	27,26	23,80	33,69



Gambar 2. Hasil elektroforesis protein *Bacillus sp.* UGM5
a. enzim yang telah dimurnikan, b enzim kasar
c. marker

Hal senada dikatakan oleh Ward (1985) bahwa *Bacillus sp.* mempunyai lebih dari satu macam protease ekstraselular, yang kadangkala sukar dipisahkan satu sama lainnya dikarenakan aktivitas optimumnya terletak pada daerah yang saling berdekatan. Suhartono dkk. (1994) melaporkan bahwa *Bacillus stearothermophilus* NRRL BI172 yang ditelitinya juga mempunyai dua macam protease.

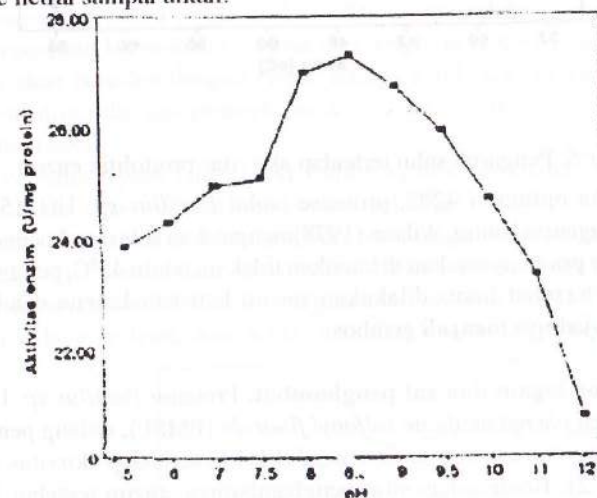


Gambar 3. Hasil elektroforesis protease *Bacillus sp.* UGM5 tidak didenaturasi pada media agar-susu skim

Pengaruh pH dan suhu. Aktivitas proteolitik *Bacillus sp.* UGM5 mengalami kenaikan mulai pH 5 dan mencapai optimum pada pH 8,5 dengan nilai aktivitas 27,26 U/mg. Pada pH yang lebih tinggi lagi aktivitasnya menurun dan pada pH aktivitasnya menjadi sangat rendah (Gambar 4).

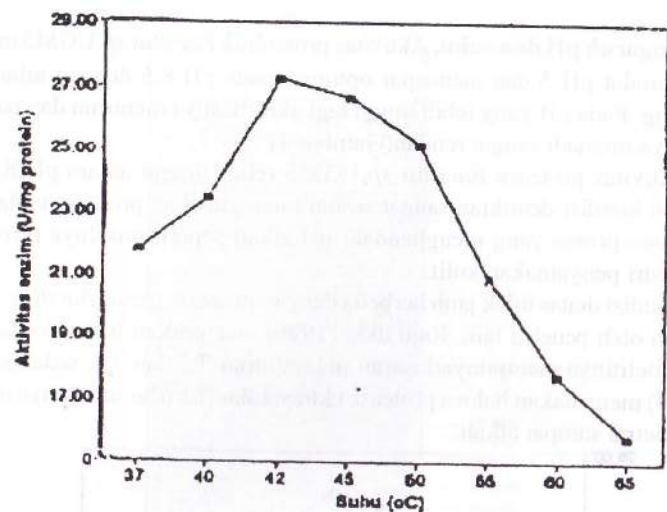
Aktivitas protease *Bacillus sp.* UGM5 relatif tinggi antara pH 8,0 sampai 9,5 dengan kondisi demikian sangat sesuai menggunakan protease isolat tersebut untuk proses-proses yang menghendaki pH alkali seperti misalnya proses batubara pada industri penyamakan kulit.

Kondisi diatas tidak jauh berbeda dengan protease genus *Bacillus* yang telah dilaporkan oleh peneliti lain. Raju dkk. (1996) melaporkan bahwa isolat *Bacillus sp.* yang ditelitinya mempunyai kisaran pH optimum 7,5 dan 9,0, sedang Suhartono dkk. (1994) menyatakan bahwa protease ekstraselular *Bacillus* umumnya merupakan protease netral sampai alkali.



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas proteolitik enzim

Aktivitas protease *Bacillus sp.* UGM5 terlihat meningkat dengan naiknya suhu dan mencapai aktivitas tertinggi pada suhu 42°C, kemudian berangsur-angsur menurun pada suhu yang lebih tinggi (Gambar 5). Protease ini mempunyai proses yang baik karena mempunyai aktivitas maksimal pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan protease mesofilik *Bacillus* yang lain. Penelitian Raju dkk. (1996) menunjukkan isolat *Bacillus sp.* yang digunakannya mempunyai aktivitas maksimal pada suhu 37°C, sedang Takami dkk. (1991) melaporkan *Bacillus sp.* 101 yang ditelitinya mempunyai suhu optimum 30°C. Pada umumnya enzim mempunyai aktivitas tertinggi pada kisaran suhu 30-40°C atau sedikit lebih tinggi diatas suhu pertumbuhan organismenya (Richardson, 1976), namun ada juga enzim yang bersifat termostabil sehingga tahan sampai suhu diatas 75°C (Reed, 1994).



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas proteolitik enzim

Dengan suhu optimum 42°C, protease isolat *Bacillus sp.* UGM5 dapat digunakan sebagai agensia bating. Wilson (1978) mengatakan suhu awal pengolahan pada tahapan proses pra-penyamakan disarankan tidak melebihi 45°C, penggunaan panas diatas suhu tersebut harus dilakukan secara hati-hati karena cenderung menyebabkan kulit jadinya menjadi gembos.

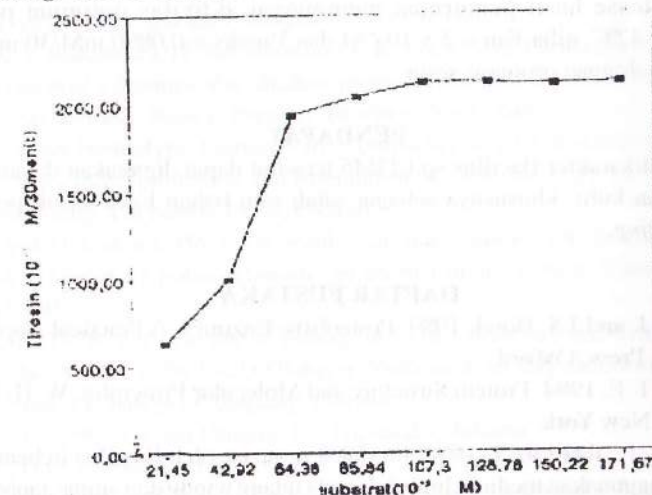
Pengaruh ion logam dan zat penghambat. Protease *Bacillus sp.* UGM5 sangat dihambat oleh *phenyl methane sulfonyl fluoride* (PMSF), sedang pengaruh penambahan *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) terhadap aktivitas enzim sangat kecil (Tabel 2). Berdasarkan sifat penghambatnya, enzim tersebut bukan merupakan protease-logam akan tetapi digolongkan dalam protease-serin, kesimpulan ini didukung dengan pH optimumnya sekitar 8,5. PMSF akan berkaitan dengan residu serin pada sisi aktif enzim sehingga aktivitas enzim menjadi sangat berkurang (Beynon dan Bond, 1986, Tsuchiya dkk, 1992). Ward (1985) juga mengatakan bahwa protease-serin mempunyai pH optimum diatas pH netral.

Tabel 2. Pengaruh zat penghambat dan ion logam terhadap aktivitas protease.

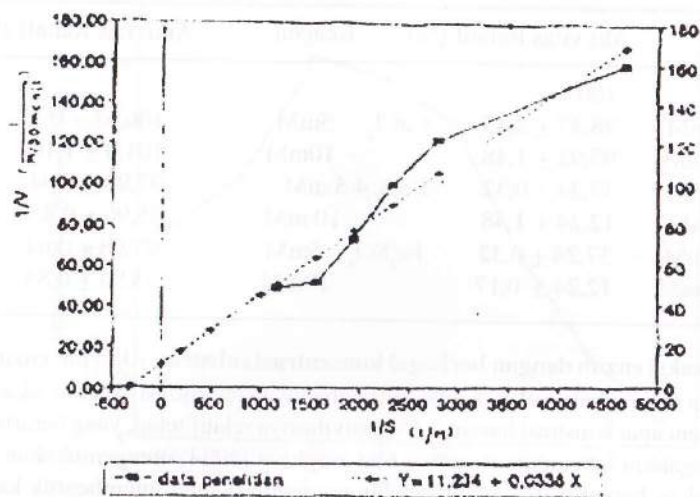
Reagen	Aktivitas Relatif (%)	Reagen	Aktivitas Relatif (%)
Kontrol	100		
EDTA 1 mM	98,47 ± 2,45	CaCl ₂ 5mM	106,63 ± 0,57
10 mM	95,92 ± 1,48	10mM	101,0 ± 1,10
PMSF 1 mM	37,24 ± 0,32	Fe ₂ S ₆ 4 5 mM	97,98 ± 0,04
10 mM	12,24 ± 1,48	10 mM	95,96 ± 0,85
PMSF 1 mM	37,24 ± 0,32	Fe ₂ SO ₄ 5mM	97,98 ± 0,04
10 mM	12,24 ± 0,17	10mM	95,96 ± 0,85

Reaksi enzim dengan berbagai konsentrasi substrat. Aktivitas enzim ha pemurnian meningkat sejalan dengan bertambahnya konsentrasi substrat, akan tet setelah mencapai konsentrasi kasein 2,5% aktivitasnya relatif tetap, yang berarti enz telah mengalami kejenuhan (Gambar 6). Creighton (1984) mengemukakan bah substrat akan bereaksi dengan enzim hingga jenuh dengan membentuk kompl enzim-substrat sehingga peningkatan konsentrasi substrat tidak lagi meningkat kecepatan reaksi.

Persamaan garis Lineweaver-Burk yang diperoleh dapat dilihat pada Gam 7. Protease *Bacillus sp.* UGM5 mempunyai nilai $K_m = 3 \times 10^{-3}$ M dan $V_{max} = 0,08$ M/30 menit. Harga K_m enzim sangat bervariasi tetapi pada umumnya berkisar ant 10^{-6} - 10^{-3} M tergantung jenis substrat dan kondisi lingkungannya (Winarno, 198 Dengan nilai sebesar 3×10^{-3} M, K_m protease *Bacillus sp.* UGM5 tersebut termas bernilai sedang, terletak diantara kisaran nilai K_m enzim pada umumnya.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas protease



Gambar 7. Persamaan garis Lineweaver-Burk protease *Bacillus* sp.UGM5

KESIMPULAN

Bacillus sp. UGM5 mempunyai dua macam protease ekstraseluler. Pemurnian dengan CM-Sephadex C-50 meningkatkan aktivitas spesifik enzim 23,8 kali dengan *recovery* 33,69%. Protein hasil pemurnian masih mempunyai empat pita dan belum bisa ditentukan dengan pasti berat molekul dari protein enzim.

Protease hasil pemurnian mempunyai aktivitas optimum pada 8,5, temperatur 42°C, nilai $K_m = 3 \times 10^{-3}$ M dan $V_{maks} = 0,0890$ mM/30 menit, dan termasuk golongan protease-serin.

PENDAPAT

Sifat/karakter *Bacillus* sp.UGM5 tersebut dapat digunakan dalam industri penyamakan kulit, khususnya sebagai salah satu bahan baku untuk pembuatan agensia *bating*.

DAFTAR PUSTAKA

- Beynon, R.J. and J.S. Bond. 1989. *Proteolytic Enzymes, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
- Creighton, T. E. 1984. *Protein Structure and Molecular Principles*. W. H. Freeman Co, New York.
- Jenny, B. S. L., dan Lily T. 1994. Produksi protease oleh *Bacillus licheniformis* menggunakan medium limbah kepala udang windu dan ampas tapioka. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan* V (2):1

- Kwan, K.K.H., S. Nakai and B.J. Skura. 1983. Comparison of four methods for determining protease activity in milk. *J. Food Sci.* 48 (5): 1418.
- Lacini, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T^A *Nature* 227 : 680.
- Malathi, S and R. Chakraborty. 1991. Production of alkaline protease by a *Neurospora* *pergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl. Environ.Microbiol.* 57 (3):712.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay methods of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal.biochem.* 83:346.
- Raju, A.A., N.K. Chandrababu, N. Samivelu, C. Rose and N.M. Rao. 1996. Ecofriendly enzymatic dehairing using extracellular protease from a *Bacillus* Species isolate. *JALCAQ* 91 (5): 115.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, New York.
- Richardson, T. 1976. *Enzymes*. In: *Principles of Food Science*. Ed. by O.R. Fennell. Marcel Dekker Inc., New York.
- Setiyo, Sujadi, Lies Mira Yusiati dan Jamhari, 1995. The production of non-collagen protease of pancreatic gland, papaya, pineapple juice and microbes for use as a bating agent in the technology of leather processing. *Buletin Peternakan dan Perikanan* khusus. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Suhartono, M.T., Franky W. dan Teja I. 1994. Pemurnian protease *Bacillus stearothermophilus* NRRL BI 172 dengan filtrasi gel. *Buletin Industri dan Teknologi Pangan* V (2):56.
- Takami, H., S. Nakamura, R. Aono and K. Horikoshi. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from Alkalophilic *Bacillus* sp. N. *AIH-101. Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (10):1667
- Tsuchiya K, Y. Nakamura, H. Sakashita and T. Kimura 1992. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from Alkalophilic *Thermococcus* sp. H5682. *Biosci. Biotech. Biochem* 56(2):246.
- Ward, O.P. 1985. *Proteolytic Enzymes In: Comprehensive Biotechnology* edited by M. Moo Young. The Principle Application and Regulation of Biotechnology. Ed. by Moo Young. Pergamon Press, Oxford.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The Reality of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electroforisis. *J. Biol. Chemical* 244:4406
- Wilson, R. H. 1978. *The Practise of Bating*. In : *The Chemistry and Technology of Leather* Vol. 1 Ed. by Fred O'flaherty, William T. Roddy and Robert M. L. at. Robert E Krieger Company, Florida.
- Winarno, F.G. 1983. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia, Jakarta.
- Yum, D.Y., H.C. Chuno, D.H. Bai, H.H. Oh, and J.H. Yu, 1994. Purification and characterization of alkaline serine protease from an Alkalophilic streptomycin-resistant *Bacillus* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (3):470.